

Д. В. ГАРИВЯН, И. С. ДАНИЕЛЯН, Ю. С. БАБАЯН, Г. Г. ГАЛСТЯН,
Р. А. ЗАХАРЯН, Б. Т. ГАРИВДЖАНЫ

ВЛИЯНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ПРЕПАРАТОВ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ НА ОПУХОЛЕВУЮ ДНК

Проведено сравнительное исследование особенностей первичной и вторичной структуры ДНК опухолей, обработанных при трансплантации препаратами нуклеиновых кислот. Установлено, что под воздействием препаратов РНК структурные характеристики опухолевой ДНК частично восстанавливаются. Определено также содержание циклических нуклеотидов в безбелковых экстрактах опухолевой ткани.

Известно, что особенности злокачественного роста связаны с изменением генетического материала клетки. Пусковым механизмом развития опухолевых заболеваний, по всей вероятности, являются мутации, накопление в клетке повреждений ДНК, нарушение метилирования ДНК, локальные изменения ее конформации. Энзиматическое метилирование цитозиновых остатков ядерной ДНК у животных участвует в регуляции экспрессии генов и клеточной дифференцировке [4, 10].

Одним из специфических признаков действия опухоли на организм является вызываемая ею иммунодепрессия, биохимические механизмы которой до сих пор остаются неясными. Предполагается, что присутствие в опухолях нуклеинового фактора достаточно для подавления основных типов иммунного ответа, причем механизм иммунодепрессивного фактора связан с его конкуренцией с иммунной ДНК или РНК [3].

Можно предположить, что введение в организм опухоленосящих животных препаратов нуклеиновых кислот может изменить биохимию злокачественной клетки, усилить иммунный ответ организма, увеличить чувствительность опухоли к специфической терапии. Эти эффекты могут быть в коррелятивной связи с изменениями в структуре ДНК.

Нами проведено сравнительное исследование особенностей первичной и вторичной структур ДНК опухолей, развившихся из клеток, которые перед трансплантацией обрабатывали препаратами ДНК и РНК.

Материал и методы

Опыты проводились на 50 белых беспородных крысах-самцах массой 100—110 г. Животные были подразделены на пять групп (по 10 в каждой). Трем подопытным группам трансплантировали опухолевые клетки саркомы-45 (С-45), предварительно суспендированные в физиологическом растворе с препаратами ДНК и двуспиральной РНК (дс РНК). Одновременно крысам вводили препараты нуклеиновых кислот из расчета 2 мг ДНК*, 10 мг РНК** на животное. Контрольной группе трансплантировали только опухолевые клетки. Группе интакт-

* ДНК выделена из печени животных и опухолевой ткани С-45.

** РНК двуспиральная дрожжевая выделена из препарата нуклеината натрия.

ных крыс вводился только физиологический раствор. На 15-е сутки животных забивали декапитацией. Из извлеченных после забоя органов выделяли ДНК.

ДНК выделяли по модифицированному методу Мармура (по [9]) с последующей хлороформной обработкой. Количество белка и РНК в препаратах не превышало 1,5—2%. Гиперхромность для всех препаратов—36—37%. Для определения нуклеотидного состава ДНК, включая 5-метилцитозин (5-МЦ), препараты ДНК высушивали при 105°C, гидролизовали до оснований (99% муравьиная кислота, 175°C, 30 мин). Основания разделяли с помощью двукратной одномерной восходящей хроматографии на бумаге в растворителе бутанол—вода—аммиак (60:10:0,1). Разделенные основания определяли спектрофотометрически [5]. Тепловую денатурацию ДНК проводили в буфере 0,01 SSC. Кривые плавления получены на спектрофотометре UNJCAM SP-800 при непрерывном режиме нагрева растворов ДНК со скоростью 0,25 град./мин. Для выяснения особенностей в характере поведения кривых плавления был осуществлен переход к дифференциальным кривым плавления (ДКП) [2].

Концентрацию циклических нуклеотидов в безбелковых экстрактах опухолевой ткани определяли радиоиммунным методом [12], используя стандартный набор реактивов радиохимического центра «Amersham». Суспензию опухолевой ткани (1 г) инкубировали в присутствии 5 мкг/мл дс РНК при 37°C в течение 40 минут. Реакцию останавливали добавлением 10 мМ ЭДТА. Белки экстрагировали кипячением проб в течение 3—5 минут. Осадок (белки) отделяли центрифугированием при 5000 об./мин. в течение 10 минут. Надосадочную жидкость отбирали, а осадок промывали 2 мл 50 мМ трис-HCl буфером (рН 7,4), содержащим 5 мМ ЭДТА. Концентрацию циклических нуклеотидов определяли в комбинированной надосадочной жидкости.

Результаты и обсуждение

Данные, приведенные в табл. 1, показывают, что все изученные ДНК относятся к АТ-типу и полностью удовлетворяют правилам Чаргаффа для двутяжевых ДНК. При этом уровень метилирования в ДНК из опухоли выше 1,45 против 1,02 мол% в норме. Вместе с тем в ДНК опухолевой ткани, развившейся после трансплантации опухолевых клеток, предварительно обработанных гомологичной опухолевой ДНК (оп ДНК), содержание 5-МЦ повышено до 1,63 мол%. При этом процент торможения роста опухоли составил 37. В опухолевой ДНК, развившейся после трансплантации предварительно проинкубированных опухолевых клеток с ДНК из печени здоровых животных (нп ДНК), содержание 5-МЦ почти не изменяется (1,45 и 1,42 мол%).

Таким образом, выявлена прямая коррелятивная зависимость между торможением роста опухоли и гиперметилированием ДНК, которая может существенно повысить вероятность энзиматического дезаминирования 5-МЦ и превращения его в тимин [11], что и может служить центром деспирализации ДНК, локального нарушения конформации и функционирования ДНК [7].

Обратная коррелятивная зависимость между степенью метилирования ДНК и ростом опухоли установлена в экспериментах при предварительной обработке опухолевых клеток дрожжевой РНК (процент торможения роста опухоли 24), физиологически активным компонентом которой является двуспиральная РНК [8].

Таблица 1

Степень метилирования и некоторые параметры плавления ДНК

Условия опыта	Источник ДНК	Содержание оснований в ДНК, мол %		Т. пл., °C	ΔT , °C
		5-МЦ	Г+Ц+МЦ		
Норма	печень	$1,02 \pm 0,023$	44,6	$66,5 \pm 0,2$	$6,9 \pm 0,2$
Животные с С-45. Инокуляг: опухолевые клетки	опухоль	$1,45 \pm 0,015$	44,2	$63,5 \pm 0,2$	$7,7 \pm 0,2$
опухолевые клетки+оп ДНК	"	$1,63 \pm 0,033$	42,1	$63,3 \pm 0,3$	$8,8 \pm 0,2$
опухолевые клетки+нп ДНК	"	$1,42 \pm 0,017$	43,6	$63,9 \pm 0,2$	$7,8 \pm 0,2$
опухолевые клетки+РНК	"				
In vivo	"	$1,27 \pm 0,013$	42,2	$63,2 \pm 0,2$	$7,8 \pm 0,3$
опухолевые клетки+РНК	"				
In vitro	"	$1,19 \pm 0,021$	43,8	$61,7 \pm 0,2$	$7,7 \pm 0,2$

Примечание. Приведенные изменения статистически достоверны ($p < 0,05$) по сравнению с контролем (печень, опухоль).

Кроме того, в ряде работ [1, 2] показано, что при помощи ДКП можно исследовать нарушения во вторичной структуре опухолевых ДНК. В настоящей работе получены кривые плавления и ДКП изучаемых ДНК (рисунок) и определены интервал (ΔT) и температура (Т.

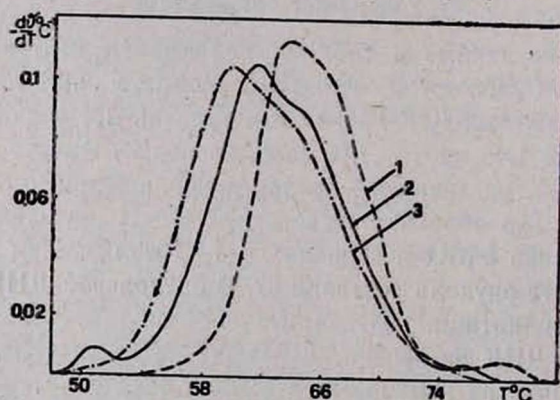


Рис. Дифференциальные кривые плавления ДНК печени здоровых животных (1), опухоли (2), опухоли животных, которым трансплантировали опухолевые клетки, предварительно проинкубированные с дс РНК (3).

пл.) плавления. Как показывают расчеты, вид ДКП ДНК опухоли, обработанной дрожжевой РНК, меньше отличается от ДКП ДНК нормы и гораздо больше от ДНК опухоли, полученной обычным путем транс-

плантации опухолевых клеток. Практически исчезают характерные для опухолевой ДНК протяженные дефектные участки, плавление которых приводит к появлению на ДКП добавочных пиков. Значения ΔT и T пл. приведены в табл. 1.

Таким образом, как показывают значения параметров плавления и вид кривой плавления (рисунок), инкубирование опухолевых клеток с РНК-ой приводит к исчезновению ряда структурных нарушений ДНК опухоли, причем, судя по этим характеристикам, РНК обладает довольно выраженным канцеролитическим эффектом при сравнении с некоторыми антибластическими веществами [1].

Тормозящее действие препаратов РНК, введенных в организм животных, на рост опухоли, метилирование ДНК, изменение ее вторичной структуры, по всей вероятности, можно объяснить участием экзогенных РНК в регуляции процессов трансляции у животных [10]. Они могут выступить в качестве конкурентов в отношении ДНК и РНК, выделяемых опухолевой клеткой [3, 6], и участвовать в иммунном ответе организма через индукцию интерферона.

Вместе с тем представляет определенный интерес выяснение вопроса индукции изменения в соотношении циклических нуклеотидов в опухолевых клетках, проинкубированных с двуспиральной РНК, поскольку известна роль двуспиральной РНК как индуктора цАМФ и интерферона в клетке и роль цАМФ и цГМФ в регуляции процессов размножения и дифференцировки клеток.

Таблица 2

Содержание циклических нуклеотидов в опухоли при действии двуспиральной РНК (пмоль/г ткани)

Время инкубации, мин	цАМФ	цГМФ
Контроль	66,4	54,8
10	98,2	85,7
20	169,7	42,5
40	201,8	19,8

Как видно из табл. 2, за 40 мин инкубации концентрация цАМФ и цГМФ в опухолевой ткани проявляет тенденцию к нормализации, то есть приближается к содержанию циклических нуклеотидов в здоровых тканях, хотя концентрация цГМФ несколько выше его физиологического содержания в тканях, а цАМФ—ниже. Можно отметить также хорошо выраженную тенденцию увеличения отношения цАМФ/цГМФ, одного из существенных показателей для характеристики направленности клеточных процессов [13].

Следовательно, кратковременные изменения концентрационных взаимоотношений цАМФ/цГМФ в опухолевой клетке, вызванные *in vitro*, оказываются достаточными и для того, чтобы вызвать относительно стабильные метаболические сдвиги, тормозящие рост опухоли

в течение изучаемого периода, проявляющиеся, в частности, в изменении метилирования и вторичной структуры ДНК.

Институт тонкой органической химии им. А. Л. Милджояна АН Арм ССР,
Институт экспериментальной биологии АН Арм ССР Поступила 30/IX 1987 г.

Ձ. Վ. ՂԱՐԻԲՅԱՆ, Ի. Ս. ԴԱՆԵԼԻԱՆ, ՅՈՒ. Ս. ԲԱԲԱՅԱՆ,
Գ. Գ. ԳԱԼՍՏՅԱՆ, Ռ. Ա. ԶԱԽԱՐԻԱՆ, Բ. Տ. ԳԱՐԻԲՅԱՆ

ՆՈՒԿԼԵՆՈՅԻՆ ԹԹՈՒՆՆԵՐԻ ԴԵՂՈՐԱՅՔՆԵՐԻ ԱԶԴԵՑՈՒՅՈՒՆԸ ՈՒՌՈՒՑՔԱՅԻՆ ԴՆԹ-Ի ՎՐԱ

Կատարված է փոխադրվածության ժամանակ նուկլեինային թթուների դեղորայքներով մշակված ուռուցքային ԴՆԹ-ի առաջնային և երկրորդային կառուցվածքների առանձնահատկությունների համեմատական ուսումնասիրություն:

Պարզվել է, որ ՌՆԹ-ի դեղորայքների ազդեցության տակ տեղի է ունենում ուռուցքային ԴՆԹ-ի կառուցվածքային բնութագրի մասնակի վերականգնում, որը, հավանաբար, կարելի է բացատրել էուկարիոտների մոտ տրանսկրիպցիայի պրոցեսի կարգավորման մեջ արտաքինածին ՌՆԹ-ների մասնակցությամբ: Նրանով, որ նրանք կարող են որպես մրցակիցներ հարաբերության մեջ մտնել ուռուցքային բջջի ԴՆԹ-ի և ՌՆԹ-ի հետ և ինտերֆերոնի ինդուկցիայի միջոցով մասնակցել օրգանիզմի իմունային պատասխանի ձևավորմանը:

Ուռուցքային հյուսվածքի ոչ սպիտակուցային մզվածքներում որոշվել է նաև ցիկլային նուկլեոտիդների քանակությունը: 40 րոպե ակտիվացմամբ ՌՆԹ-ի հետ ուռուցքային հյուսվածքի ինկուբացիայի ղեկավարում ՅԱՄՖ-ի և ՑԳՄՖ-ի խտությունը զրոսերում է կանոնավորման տենդենց:

G. V. GARIBIAN, I. S. DANIELIAN, YU. S. BABAYAN, H. G. GALSTIAN,
R. A. ZAKHARIAN, B. T. GARIBJANIAN

INFLUENCE OF NUCLEIC ACID PREPARATIONS ON TUMOR DNA

It has been established, that under the influence of RNA preparations the structural characteristics of tumor DNA are partially restored, which, apparently, may be explained by the participation of exogenous RNA in the regulation of the processes of translation in eucaryots and by the fact that they may compete with tumor cell DNA and RNA be involved in the immune response of the organism through interferon induction.

The content of cyclic nucleotides in the non-proteinic extracts of tumor tissue has also been determined. Upon incubation of the tumour tissue with RNA during 40 minutes the concentrations of cAMP and cGMP exhibit a tendency to normalization.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Бабалян Ю. С., Асланян В. М., Ананян Г. В., Гарибян Д. В. Биофизика, 1985, 30, 3, с. 414.
2. Бабалян Ю. С., Вардеванян П. О., Гарибян Д. В. и др. Биофизика, 1984, 2, с. 313.

3. Белохвостов А. С., Войтенков Б. О. Успехи современной биологии, 1983, 95, 2, с. 255.
4. Ванюшин Б. Ф. Успехи биологической химии, 1983, 24, с. 170.
5. Васильев В. К., Гарибян Д. В., Захарян Р. А. и др. ДАН СССР, 1972, 205, 3, с. 721.
6. Винтер В. Г., Аглиуллина Д. Г., Андреева И. Н. Вopr. онкол., 1978, 24, 10, с. 38.
7. Жижина Г. П., Круглякова К. Е., Тодоров И. Н., Эмануэль Н. М. Успехи современной биологии, 1986, 101, 1, с. 3.
8. Захарян Р. А., Месропян Н. П., Мовсесян А. В. и др. Экспер. онкол., 1985, 7, 3, с. 54.
9. Романов Г. А., Кирьянов Г. И., Дворкин В. М., Ванюшин Б. Ф. Биохимия, 1976, 41, 6, с. 1038.
10. Adams R. L. P., Burton R. H. CRC Crit. Rev. Biochem., 1982, 13, 4, p. 349.
11. Snelder T. W. J. Biol. Chem., 1972, 247, 9, p. 2872.
12. Steiner A. L., Pagliara A. S., Chase I. R., Kipnis D. M. J. Biol. Chem., 1972, 247, d. 1114.
13. Zellig C. G., Godberg M. D. Proc. Nat. Acad. Sci. USA., 1977, 74, 1052.

УДК 616.127—092.9

В. Ф. КУБЫШКИН, А. Ф. МАЗУРЕЦ, М. В. ДЗЮБА

НОВЫЙ ОТЕЧЕСТВЕННЫЙ КОФЕРМЕНТНЫЙ ПРЕПАРАТ КОБАМАМИД КАК СРЕДСТВО МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ КОРРЕКЦИИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ КАРДИОМИОПАТИИ

С целью коррекции белково-синтетических процессов в миокарде у животных с экспериментальной кардиомиопатией применялся кобамамидный кофермент. Установлен выраженный анаболический эффект препарата и корригирующее его воздействие на магистральные пути биологического окисления в сердечной мышце.

Важнейшим патогенетическим механизмом некоронарогенного повреждения сердечной мышцы является расстройство белкового и углеводно-энергетического метаболизма [1]. Известен определенный стимулирующий эффект цианокобаламина на синтез сократительных белков миокарда, в первую очередь, актомиозина [4]. Вместе с тем анаболическая направленность природной формы витамина выражена относительно слабо, что не позволяет в большинстве случаев эффективно использовать цианокобаламин с целью коррекции протеосинтеза.

Выбор в качестве средства метаболической терапии полученного отечественной фармацевтической промышленностью коферментного препарата кобамамид (КМ) обусловлен существенными преимуществами последнего по сравнению с нативной формой [12]. Установлено, что кобамамидный кофермент играет в организме роль активной простетической группы биокатализаторов энзимных реакций, результатом которых является образование субстрата энергетического цикла лимонной кислоты—сукцинил-СоА, осуществляет восстановление рибонуклеотидов до дезоксирибонуклеотидов, принимает участие в других ферментативных регуляторных процессах [5]. Высокая степень сродства к апоферменту обеспечивает оптимизацию скорости ферментатив-